柑橘試管珠心胚培養之應用

黃麗春[1]　張玉莉[2]　韓慧玉[2]　黃寶蓮[2]
中央研究院植物研究所研究員[1]及研究助理[2]

被子植物常可藉由珠心組織培養誘導珠心胚之分化[(3)]，其中數科植物甚易產生珠心胚如芸香科中柑橘類，柑橘珠心胚之產生具有生物學及農業上之意義，生物學上珠心胚之產生可作爲試管體胚(somatic cell embryogenesis)及自然珠心胚(apomxis)形成之研究，農業上則用於無性繁殖，且珠心胚分化之植株亦爲自感染病株重新獲得無病毒(virus - free)，無類病毒(viroid - free)及無螺旋菌質體(spiroplasma - free)等健康苗之途徑。

依柑橘種子發育一般分爲兩類即多胚及單胚，多胚柑橘指種子中除一個有性胚外，尚有數個自珠心組織分化之珠心胚，其數可自1至10胚以上，單胚柑橘指種子中僅有一個有性胚，而無其他之無性胚。從事單胚柑橘珠心組織之試管培養，亦可獲得珠心胚之發育[(1)]。本研究室已發表誘導柑橘珠心胚培養之條件[(2)]，其順利移植於溫室中繼續生長，及自單胚柑橘珠心組織誘導珠心胚進而分化珠心苗之試驗。本研究室已成功的建立麻豆白柚及麻豆文旦珠心苗之試管培養，並將珠心苗移交台中農業試驗所，嘉義分所及台南農改場。圖1爲麻豆文旦珠心苗移殖於台南農改場，新化分場之生長情形。

珠心胚之試管誘導及其分化之珠心苗，亦供爲無性繁殖柑橘根砧之重要途徑，以期獲得大量性狀相同之小苗作爲根砧之用。多胚柑橘自然分化珠心苗之數量少時，則以人工培養誘導更多珠心胚及珠心苗。

試管珠心胚誘導後，若經長時間之繼續誘導，即珠心胚繼代分化珠心胚，則常導致變異，產生變異品系之珠心苗。本研究室自多種多胚及單胚柑橘從事此一方向之試驗，如表*1.*，可供柑橘育種，育出之小苗陸續移交台中農試所，嘉義分所及關西柑橘工作站。

基於柑橘珠心組織培養可誘導珠心胚之分化，此種珠心胚來自珠心組織之細胞故爲無性胚，亦爲不定胚，可供遺傳工程之基因轉殖。將特殊性狀之基因，經人工方法建造於特殊載體(vector)後，可用二種方法，基因槍或裂殖菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之感染，將外來基因融入植物細胞染色體中，以產生新的遺傳組合，臻至育種之目的。本研究室系採用後者以裂殖菌之共同培養，將抗鱗翅目(Lepidoptera)或鞘翅目(Coleoptera)，即抗菜蛾類或甲蟲類之基因，經感染植物細胞過程，植入植物細胞。此種天然遺傳工程基因轉殖法，本研究室已先後利用於椪柑及桶柑。抗甲蟲類基因(pBinAR - BTT)系得自韓國Hallym University, Dr. S.L. Rhim及抗甲蟲類基因(pWB139 / WAg11)系得自美國密蘇里，聖路易之Washington University Dr. W.M. Barnes, 經裂殖菌感染後之珠心組織細胞，再分化之珠心胚(圖2)及珠心苗(圖3)，已先後移植嘉義農專及嘉義農試分所，而其西方點墨法之生化鑑定其抗蟲蛋白，如圖4則可証明其抗蟲基因之順利轉殖。

關鍵詞：抗蟲基因轉殖、珠心胚、珠心苗、柑橘

結　論

試管內柑橘珠心胚之誘導及珠心苗之分化，其於農業上之應用如下，1.去除病毒，類病毒及螺旋菌質體，以獲得健康苗。2.藉其珠心組織細胞大量產生無性胚之方法，可獲得大量珠心苗供為無性大量繁殖。3.誘導珠心胚之變異，產生變異品系獲得新種。4.藉珠心細胞形成珠心胚之過程轉植抗蟲基因以產生抗蟲之珠心胚及珠心苗。本研究室已先後建立上述四項工作，並將珠心苗移交台中農試所，嘉義分所，關西柑橘工作站，台南農改場及嘉義農專，並以合作研究獲得國外之抗菜蛾類基因及抗甲蟲類基因，藉其產生抗蟲柑橘苗，至今已有3株小苗測得其抗甲蟲基因之表現，將繼續合作從事此一方面之生化及生物鑑定。

表 *1.* 柑橘珠心胚之培養，珠心苗之分化及其移植於農業單位。

Table *1.* Nucellar embryogenesis of Citrus in vitro and growth of nucellar plants transplanted in screen houses

Nucellar embryogenesis of citrus in vitro		Nucellar plants of citrus in vitro transplanted in screen house		
Polyembryonic species		台中農試所	嘉義分所	關西工作站
Citrus aurantium	酸橙		8	7
C. jambhiri	粗皮檸檬			
C. limonia	黎檬	36		36
C. reshni (Cleopatra)	美女橘	33	23	5
C. sunki	酸橘			
C. reticulata cv. Ponkan	椪柑			
C. sinensis cv. Liu Tzen	柳橙	43	20	3
C. tankan cv. Hai Li	海梨	10	27	50
C. hybrid cv. Murcott	茂谷	12	20	10
Poncirus trifoliata	枳殼		4	
Monoembryonic Species				
C. grandis				
cv. Ma Dou Bai You	麻豆白柚	6	13	5
cv. Ma Dou Wen Dan	麻豆文旦	23	50	2
		163	163	94

誌　謝

本研究計畫承蒙農委會經費支持、及農委會柑橘小組、台中農業試驗所、嘉義分所、關西柑橘工作站、嘉義農專、台南農改場共同合作特此誌謝。

參考文獻

1. Huang, L.C., W.L. Chen and D.S. Chiu. 1988. In vitro graft－enhanced nucellar pllant development in the monoembryonic *Citrus qrandis* L. J. Hort. Sci. 63:705－709。
2. Huang, L. C., W. L. Chen, K. Y. Yeong and B. L. Huang. 1990. Hormonal require－ments for proliferation of pseudobulils in citrus nucellus cultures. Bull. Acad. Sin.31: 211－216。
3. Tisserat, B., E. B. Easn and T. Murashige. 1979. Somatic embrygenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1:1－78。

討　論

許圳塗教授問：

BT－toxin 基因國內其他單位使用不少，為何要送到國外做分析？是否為了方便或是他們能夠配合？

黃麗春博士答：

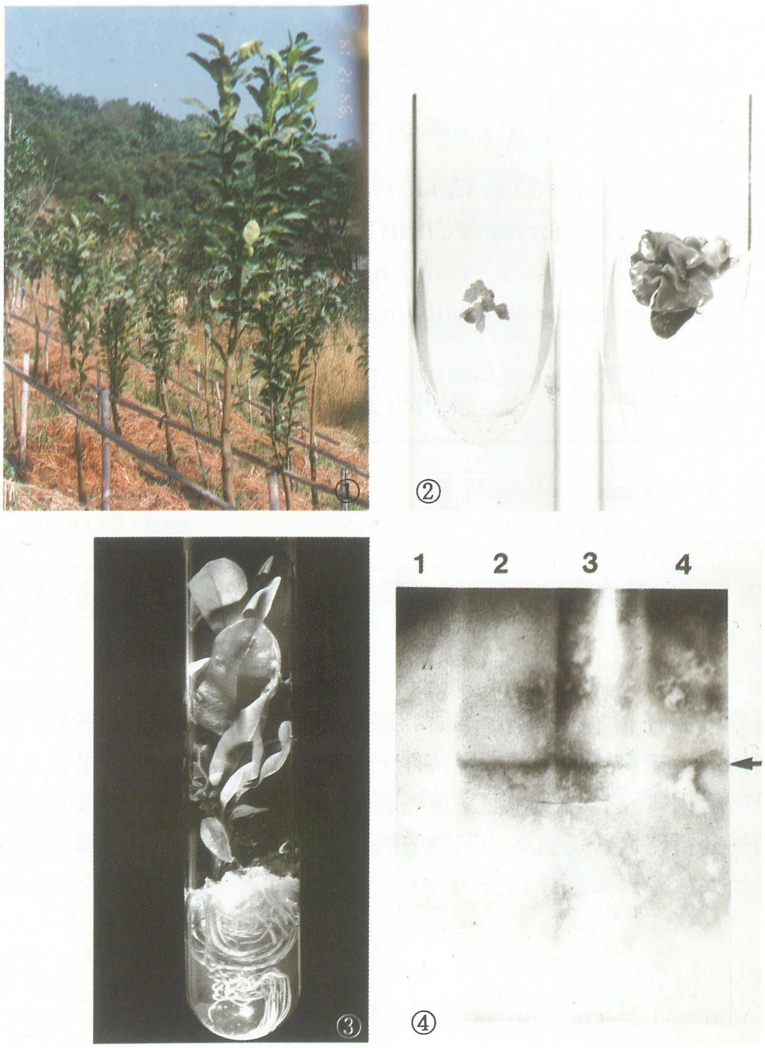
國内是否能分析很好，並不清楚，本研究基因是來自國外，他們樂意我們將材料送回去分析。另外，基因轉殖入植物體，如何表現抗性，是在果實、葉片、莖或是根。現在已進步到有選擇性，也就是可能果實没有表現，而葉片有表現，所以我們吃果實就沒有問題，有時是全株都有表現。送國外分析路途較遙遠，小苗送去較不方便，所以請嘉義農專、嘉義農試分所協助培育小苗，嫁接長大後，再採葉片送去。

許圳塗教授問：

起動子（promoter）是constitutive 還是selective ？

黃麗春博士答：

是constitutive ，但目前已經考慮selective tissue and time specific之起動子。


①
②
③
④
1
2
3
4

圖片說明

圖 *1.* 麻豆文旦試管珠心苗生長於台南農改場，新化分場。

Fig. *1.* Nucellar plants obtained form nucellar embryogenesis in vitro of *Citrus grandis* cv. Ma Dou Wen Dan growing in Taiwan District Agricultural Improvement Station, Hsin Hue Branch Station.

圖 *2.* 椪柑之抗甲蟲基因轉殖。左：對照組之珠心胚因無抗蟲基因之轉入而不耐含 Kanamycin 之培養基，導致珠心胚不能繼續分化而萎縮，右：珠心胚呈現抗蟲基因之轉入，而耐 Kanamycin, 珠心胚可繼續分化新胚。

Fig. *2.* Insect resistance for beetle via nucellar embryogenesis by coculturing Agro for gene transformation of *C. reticulata* cv. Ponkan mandarin. Left: control embryos failed to development in kanamycin involved medium. Right: kanamycin stress selected embryos.

圖 *3.* 抗甲蟲基因轉殖之椪柑試管珠心苗。

Fig. *3.* Insect resistance for beetle of Ponkan mandarin plant growing in vitro via nucellar embryogenesis by coculturing with Agro for gene transformation.

圖 *4.* 生化分析測得椪柑植株抗甲蟲蛋白，68KD，之西方墨點。

(①)爲無毒蛋白之對照組植株，(②～④)3基因轉殖植株呈現抗蟲蛋白之出現。

Fig. *4.* Western blotting analyses for BT gene transformation for beelte resistance on Ponkan mandarin. 1. control plant showed no detection of toxin, 68kd. 2 – 4, plants disclosed the presence of toxin as arrow pointed.

Citriculture Applications of Nucellar Embryogenesis in Vitro

Li-Chun Huang[1], *Yu-Li Chang*[2], *Huei-Yue Han*[2] *and Bau-Lian Huang*[2]

Research follow[1] and Resaerch Assistants[2]
Institute of Botany, Academia Sinica, Nankang, Taipei

Summary

Nucellar embryogenesis in vitro is being exploited for citriculture applications: elimination of viruses, viroids and spiroplasma; rapid clonal propagation of rootstocks; induction of desirable somatic cell mutants; and genetic transformation with agronomically useful genes. Nucellar plants of two cultivars of *C. grandis*, Ma Dou wen Dan and Ma Dou Bai You, have been transferred to the Tainan District Agricultural Improvement Station at Hsin Hue Branch station for pathogen tests and cultivars performance evaluations. At least ten species and cultivars have been propagated by nucellus culture and the plants released to the Taiwan Agricultural Research Institute at Taichung, Chiayi and Guangshi for discovery of possible desirable somaclonal varients. Through collaborations, we have also generated Ponkan and Tankan plants from nucelli that had been co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens* carrying Ti plasmids containing *Bacillus thuringiensis* genes for proteins toxic to coleopteran pests and lepidopteran pests. The plants are being multiplied for detailed biochemical analyses and insecticidal evaluations. Three plants have already tested positively by western analysis for the coleopteran insecticide.

Key words: Insect resistasnce via gene transformation, Nucellar embryogenesis, Nucellar plant, Citrus